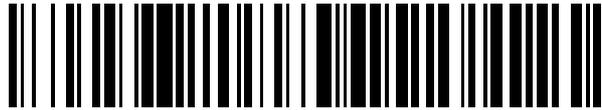


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 790**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)  
**C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01)  
**C12P 13/06** (2006.01)  
**C12P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009 E 09157283 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2108693**

54 Título: **Microorganismo que produce O-acetilhomoserina y método de producción de O-acetilhomoserina usando el microorganismo**

30 Prioridad:

**04.04.2008 US 62835**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.06.2015**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500 NAMDAEMUNRO 5-GA  
JUNG-GU, SEOUL 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, CHUL HA;  
KIM, SO YOUNG;  
SHIN, YOUNG UK;  
UM, HYE WON;  
CHANG, JIN SOOK;  
CHO, YOUNG WOOK;  
LEE, HAN JIN;  
HEO, IN KYUNG;  
SEO, CHANG IL y  
NA, KWANG HO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 537 790 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo que produce O-acetilhomoserina y método de producción de O-acetilhomoserina usando el microorganismo

## Antecedentes

5 La metionina es uno de los aminoácidos esenciales del cuerpo humano que se ha usado ampliamente como aditivos de piensos y alimentos y se ha usado además como material de partida de síntesis para disoluciones médicas y suministros médicos. La metionina actúa como precursor de compuestos tales como colina (lecitina) y creatina y al mismo tiempo se usa como material de partida de síntesis para cisteína y taurina. La metionina también puede proporcionar azufre. La S-adenosil-metionina se deriva de L-metionina y desempeña un determinado papel en proporcionar grupo metilo en el cuerpo humano y también está implicada en la síntesis de diversos neurotransmisores en el cerebro. La metionina y/o S-adenosil-L-metionina (SAM) inhibe la acumulación de grasa en el hígado y las arterias y alivia la depresión, inflamación, enfermedad hepática y dolor muscular, etc.

Las funciones *in vivo* de la metionina y/o S-adenosil-L-metionina conocidas hasta la fecha son las siguientes.

15 1) Inhibe la acumulación de grasa en el hígado y las arterias promoviendo el metabolismo lipídico y mejora la circulación sanguínea en el cerebro, corazón y riñón (J Hepatol. Jeon BR *et al.*, marzo de 2001; 34(3): 395-401).

2) Promueve la digestión, detoxificación y excreción de sustancias tóxicas y la excreción de metales pesados tales como Pb.

3) Puede administrarse como agente contra la depresión a la dosificación de 800 - 1.600 mg/día (Am J Clin Nutr. Mischoulon D. *et al.*, noviembre de 2002; 76(5): 1158S-61S).

20 4) Potencia las funciones hepáticas (FASEB J. Mato JM., enero de 2002; 16(1): 15-26) y particularmente es eficaz en la enfermedad hepática provocada por el alcohol (Cochrane Database Syst Rev., Rambaldi A., 2001; (4): CD002235).

5) Tiene efecto antiinflamatorio sobre enfermedades articulares y óseas y promueve la recuperación articular (ACP J Club. Sander O., enero-febrero de 2003; 138(1): 21, J Fam Pract., Soeken KL *et al.*, mayo de 2002; 51(5): 425-30).

25 6) Es un nutriente esencial para el cabello. Proporciona nutrición al cabello y de ese modo previene la alopecia (Audiol Neurootol., Lockwood DS *et al.*, septiembre-octubre de 2000; 5(5): 263-266).

La metionina puede sintetizarse química o biológicamente para aplicarse a piensos, alimentos y medicamentos.

En la síntesis química, se produce metionina principalmente por hidrólisis de 5-(β-metilmercaptoetil)-hidantoína. La metionina sintetizada químicamente tiene la desventaja de producirse sólo como una mezcla de tipo L y tipo D.

30 En la síntesis biológica, se produce metionina mediante el método de uso de proteínas implicadas en la síntesis de metionina. Se biosintetiza L-metionina a partir de homoserina mediante la acción de la enzima expresada por genes tales como *metA*, *metB*, *metC*, *metE* y *metH*, en *E. coli*. Particularmente, *metA* es el gen que codifica para homoserina O-succiniltransferasa que es la primera enzima necesaria para la biosíntesis de metionina, y convierte homoserina en O-succinil-L-homoserina. La O-succinilhomoserina liasa o cistationina gamma sintasa codificada por el gen *metB* convierte O-succinil-L-homoserina en cistationina. La cistationina beta liasa codificada por el gen *metC* convierte cistationina en L-homocisteína. *MetE* codifica para metionina sintasa independientemente de cobalamina y *metH* codifica para metionina sintasa dependiente de cobalamina, convirtiendo ambas L-homocisteína en L-metionina. En este momento, la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa codificada por *metF* y la serina hidroximetiltransferasa codificada por *glyA* funcionan en conjunto para sintetizar N(5)-metiltetrahidrofolato que proporciona el grupo metilo necesario para la síntesis de L-metionina.

40 Se sintetiza L-metionina mediante una serie de reacciones orgánicas por las enzimas anteriores. La modificación genética en las proteínas anteriores u otras proteínas que afectan a las proteínas anteriores podría dar como resultado el aumento de la síntesis de L-metionina. Por ejemplo, la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2000/139471 describe un método de producción de L-metionina con la *Escherichia sp.* de la que se delecionan los genes *thrBC* y *metJ* en el genoma, se sobreexpresa *metBL* y se reemplaza *metK* por un mutante rezumante. Además, la publicación de patente estadounidense n.º US2003/0092026 A1 describe un método de uso de un microorganismo deficiente en *metD* (inhibidor de la síntesis de L-metionina) que pertenece a *Corynebacterium sp.* La publicación de patente estadounidense n.º US2002/0049305 describe un método para aumentar la producción de L-metionina aumentando la expresión de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (*metF*).

50 La metionina producida mediante el método biológico es de tipo L, lo que tiene ventajas, pero la cantidad de producción es demasiado pequeña. Esto se debe a que la ruta de biosíntesis de metionina tiene sistemas de regulación por retroalimentación muy estrictos. Una vez que se sintetiza metionina a un determinado nivel, la metionina como producto final inhibe la transcripción del gen *metA* que codifica para la proteína primaria para el inicio de la biosíntesis de metionina. La sobreexpresión del propio gen *metA* no puede aumentar la producción de

metionina porque el gen *metA* se suprime por la metionina en la fase de transcripción y luego se degrada por las proteasas intracelulares en la fase de traducción (Dvora Biran, Eyal Gur, Leora Gollan y Eliora Z. Ron: Control of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* by proteolysis: Molecular Microbiology (2000) 37(6), 1436-1443). Por tanto, muchas de las patentes previas se centraron en cómo liberar el gen *metA* de su sistema de regulación por retroalimentación (documentos WO2005/108561, WO1403813).

La publicación de patente estadounidense n.º US2005/0054060A1 describe un método para sintetizar homocisteína o metionina mediante cistationina sintasa modificada (O-succinilhomoserina liasa) que usa metilmercaptano (CH<sub>3</sub>SH) o sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) directamente como fuente de azufre, no cisteína. Sin embargo, los expertos en la técnica entienden bien que la cistationina sintasa puede unirse a diversos precursores de metionina en las células y de ese modo producir subproducto a alto nivel. Por ejemplo, se notificó que la cistationina sintasa acumula altos niveles de homolantionina mediante la reacción secundaria de O-succinilhomoserina y homocisteína (J. Bacteriol (2006) vol. 188: págs. 609-618). Por tanto, la sobreexpresión de cistationina sintasa puede reducir la eficacia de la reacción intracelular debido al aumento de su reacción secundaria. Además, este método tiene muchas desventajas. Este procedimiento usa rutas metabólicas intracelulares que tienen reacciones secundarias y sistemas de regulación por retroalimentación. Además este procedimiento usa H<sub>2</sub>S o CH<sub>3</sub>SH que tienen una grave citotoxicidad para las células. Por tanto, el rendimiento de producción de metionina es comparativamente pequeño.

Para solucionar estos problemas, el presente inventor ha desarrollado un procedimiento de dos etapas que comprende; una primera etapa de producción del precursor de L-metionina mediante fermentación de *E. coli*; y una segunda etapa de conversión del precursor de L-metionina en L-metionina mediante reacción enzimática (documento PCT/KR2007/003650). Este procedimiento de dos etapas puede solucionar los problemas anteriores, tales como citotoxicidad de sulfuros, regulación por retroalimentación por metionina y SAMe, descomposición del producto intermedio por enzimas intracelulares (por ejemplo cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa y O-acetilhomoserina sulfhidrilasa). Además, en contraposición al método de síntesis química de metionina que produce una forma mixta de D-metionina y L-metionina, el procedimiento de dos etapas es muy eficaz produciendo sólo L-metionina selectivamente.

En este procedimiento de dos etapas, el rendimiento de producción del precursor de metionina es uno de los factores clave para el aumento del rendimiento de producción de metionina. Para aumentar el rendimiento de síntesis del precursor de metionina, O-acetilhomoserina, es realmente importante una buena combinación de aspartocinasa fuerte, homoserina transferasa y O-acetilhomoserina transferasa. Con los antecedentes mencionados anteriormente, los presentes inventores construyeron el precursor de L-metionina produciendo una cepa que se caracteriza por lo siguiente; a) la actividad homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31) se introduce y se potencia por la integración de genes seleccionados de *Corynebacterium sp.*, *Leptospira sp.*, *Deinococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* o *Mycobacterium sp.*; o b) la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC 2.7.2.4 o 1.1.1.3) se potencia, o c) una combinación de a) y b).

### Sumario

La presente invención proporciona una *Escherichia coli* que puede producir O-acetilhomoserina, caracterizada porque:

a) la *Escherichia coli* contiene un gen de *Deinococcus sp.* o *Mycobacterium sp.* que codifica para un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa; y

b) la *Escherichia coli* sobreexpresa un gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa o expresa un gen que codifica para un polipéptido de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa mutado de manera que se potencia la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa,

y un método de producción del precursor de L-metionina usando la cepa.

### Breve descripción de los dibujos

La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende de la mejor manera con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un diagrama que ilustra la manipulación genética de la cepa que produce el precursor de metionina.

La figura 2 es un diagrama que ilustra las estructuras químicas del procedimiento de 2 etapas para la producción de metionina.

La figura 3 es un diagrama esquemático de pCJ-MetX-CL para la expresión del gen *metX*.

### Descripción detallada

La presente invención se refiere a una *Escherichia coli* que puede producir O-acetilhomoserina, caracterizada porque:

a) la *Escherichia coli* contiene un gen de *Deinococcus sp.* o *Mycobacterium sp.* que codifica para un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa; y

b) la *Escherichia coli* sobreexpresa un gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa o expresa un gen que codifica para un polipéptido de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa mutado de manera que se potencia la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa,

y a un método de producción del precursor de L-metionina usando la cepa.

El término "precursor de L-metionina" tal como se usa en el presente documento se refiere a una O-acetilhomoserina.

El término "cepa que produce el precursor de L-metionina", tal como se usa en el presente documento se refiere a *Escherichia coli* (a continuación en el presente documento denominada "*E. coli*") que puede acumular el precursor de L-metionina mediante manipulación según la presente invención.

Se da a conocer en el presente documento una cepa que produce el precursor de L-metionina en la que se deleta o se debilita un gen implicado en la descomposición de O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina auténtica y en su lugar se introduce o se potencia un gen implicado en la síntesis de O-acetilhomoserina. También se da a conocer en el presente documento una cepa en la que se bloquea o se debilita la ruta de biosíntesis de treonina para potenciar la producción de O-acetilhomoserina. Además se da a conocer en el presente documento una cepa en la que se introduce, se sobreexpresa o se potencia la actividad de homoserina O-acetiltransferasa libre del sistema de regulación por retroalimentación. Además se da a conocer en el presente documento una cepa en la que se sobreexpresa o se potencia la actividad de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa. También se da a conocer en el presente documento una cepa en la que se introduce, se sobreexpresa o se potencia la actividad de homoserina O-acetiltransferasa libre del sistema de regulación por retroalimentación y se sobreexpresa o se potencia la actividad de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa.

Más particularmente, se da a conocer en el presente documento una cepa que produce el precursor de L-metionina deletando el gen *metB* implicado en la descomposición del precursor de L-metionina, el gen *thrB* implicado en la ruta de biosíntesis de treonina y el gen *metJ* que regula la transcripción de los genes de producción del precursor de L-metionina. También se da a conocer en el presente documento una cepa que produce el precursor de L-metionina desactivando el gen *metA* o *metX* auténtico implicado en la síntesis del precursor de metionina e introduciendo *metX* foráneo. También se da a conocer en el presente documento una cepa que produce el precursor de L-metionina potenciando la actividad codificada por el gen *thrA*.

También se da a conocer en el presente documento, más preferiblemente, una cepa que produce el precursor de L-metionina desactivando el gen *metA* o *metX* auténtico implicado en la síntesis del precursor de metionina e introduciendo un gen *metX* foráneo libre del sistema de retroalimentación y potenciando la actividad codificada por el gen *thrA*.

"Inactivación" tal como se usa en el presente documento se refiere a una delección o una atenuación del gen. Una delección del gen se realiza cortando una región del gen o modificando la secuencia de proteína introduciendo una secuencia génica específica en el cromosoma. El término "atenuación" o "debilitamiento" en este sentido describe la reducción o eliminación de la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo que están codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo reduciendo la actividad de la proteína modificando una región promotora del gen y la secuencia de nucleótidos de UTR en 5' o introduciendo la mutación en la región de ORF del gen diana. Mediante medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce en general hasta del 0 al 75%, del 0 al 50%, del 0 al 25%, del 0 al 10% o del 0 al 5% de la actividad o concentración de la proteína silvestre o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Para lograr una atenuación, por ejemplo, puede reducirse o eliminarse la expresión del gen o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Las dos medidas pueden combinarse opcionalmente.

La reducción en la expresión génica puede tener lugar mediante cultivo adecuado, mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica o también mediante la técnica de ARN antisentido. Estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión al ribosoma, el codón de iniciación y terminadores. El experto puede encontrar información a este respecto, entre otros, por ejemplo, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191 195 (1998)), en Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58 64 (1999)), Franch y Gerdes (*Current Opinion in Microbiology* 3: 159 164 (2000)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("*Molecular Genetics*", 6ª edición, 1995) o el de Winnacker ("*Genes and Clones*", 1990).

Se conocen de la técnica anterior mutaciones que conducen a un cambio o una reducción en las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas. Ejemplos que pueden mencionarse son los trabajos de Qiu y Goodman (*Journal of Biological Chemistry* 272: 8611 8617 (1997)), Yano *et al.* (*Proceedings of the National Academy of Sciences*,

EE.UU. 95: 5511 5515 (1998)), y Wentz y Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833 20839 (1991)). Pueden encontrarse descripciones de resumen en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como por ejemplo el de Hagemann ("General Genetics", 1986).

5 Posibles mutaciones son transiciones, transversiones, inserciones y deleciones. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos sobre la actividad enzimática, se denominan "mutaciones de cambio de sentido" o mutaciones sin sentido. Las inserciones o deleciones de al menos un par de bases en un gen conducen a "mutaciones del marco de lectura", que conducen a que se incorporen aminoácidos incorrectos o a que se interrumpa la traducción prematuramente. Si se forma un codón de terminación en la región codificante como consecuencia de la mutación, esto también conduce a una terminación prematura de la traducción. Las deleciones de varios codones conducen normalmente a una pérdida completa de la actividad enzimática. Las instrucciones sobre generación de tales mutaciones son técnica anterior y pueden encontrarse en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como por ejemplo el libro de texto de Knippers ("Molecular Genetics", 6ª edición, 1995), el de Winnacker ("Genes and Clones", 1990) o el de Hagemann ("General Genetics", 1986).

15 Pueden incorporarse mutaciones adecuadas en los genes, tales como, por ejemplo, mutaciones por deleción, en cepas adecuadas mediante reemplazo de genes o alelos.

20 En la presente invención, el término "potenciación" describe el aumento en la actividad intracelular de una enzima que está codificada por el ADN correspondiente. La potenciación de la actividad intracelular de una enzima puede lograrse mediante la sobreexpresión del gen. La sobreexpresión del gen diana puede lograrse modificando la región promotora del gen o la secuencia de nucleótidos de la región UTR en 5'. La sobreexpresión del gen diana también puede lograrse introduciendo la copia extra del gen diana en el cromosoma, transformando la cepa huésped con el vector que contiene el gen diana con un promotor o introduciendo la mutación que puede aumentar la expresión en el gen diana. La potenciación de la actividad intracelular de una enzima también puede lograrse introduciendo la mutación en la región de ORF del gen diana. Mediante medidas de potenciación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente aumenta en general en al menos el 10%, el 25%, el 50%, el 75%, el 100%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400% o el 500%, hasta un máximo del 1000% o el 2000%, basándose en la de la proteína silvestre o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Un método para preparar un microorganismo es tal como sigue.

30 En la etapa 1, se delecciona o se debilita un gen que codifica para proteínas tales como cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa en una cepa con el fin de acumular precursor de L-metionina tal como O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina.

35 El gen que codifica para cistationina gamma sintasa se indica como metB, el gen que codifica para O-succinilhomoserina sulfhidrilasa se indica como metZ y el gen que codifica para O-acetilhomoserina sulfhidrilasa se indica como metY. Un gen que codifica para la proteína que tiene la actividad mencionada anteriormente se ejemplifica mediante metB en *Escherichia coli*. La secuencia genómica del gen puede obtenerse de la secuencia genómica de *E. coli* (n.º de registro AAC75876) de la que se informa en el informe previo (Blattner *et al.*, Science 277: 1453-1462 (1997)). La secuencia genómica anterior también puede obtenerse del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y DDBJ (DNA Data Bank Japan). Otros genes que tienen la misma actividad se ejemplifican mediante metB y metY derivados de *Corynebacterium* y metZ derivado de *Pseudomonas*.

40 La cistationina gamma sintasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa tiene la actividad de convertir O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina en cistationina u homocisteína tal como se muestra en las siguientes formulas de reacción. Por tanto, cuando un gen que tiene esta actividad se delecciona o se debilita, se acumula excesivamente O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina en la disolución de cultivo.

L-cisteína + O-succinil-L-homoserina  $\rightleftharpoons$  succinato + cistationina

L-cisteína + O-acetil-L-homoserina  $\rightleftharpoons$  acetato + cistationina

45  $\text{HS}^- + \text{O-succinil-L-homoserina} \rightleftharpoons \text{succinato} + \text{homocisteína}$

$\text{HS}^- + \text{O-acetil-L-homoserina} \rightleftharpoons \text{acetato} + \text{homocisteína}$

50 En la etapa 2, se delecciona o se debilita el gen thrB que codifica para homoserina cinasa en la cepa preparada en la etapa 1. El gen thrB gene está implicado en la síntesis de O-fosfohomoserina a partir de homoserina, que entonces se convierte en treonina mediante el gen thrC. El gen thrB se delecciona o se debilita con el fin de usar la homoserina producida para la síntesis del precursor de metionina.

55 En la etapa 3, se delecciona o se debilita un regulador de la transcripción de la ruta de síntesis de metionina. Los genes metA, metB, metC, metE y metF implicados en la síntesis de metionina se reprimen mediante un sistema de regulación por retroalimentación. El gen metJ es un gen regulador de la transcripción típico en *E. coli*. Para dejar que se sobreexpresen el gen metA o metX para sintetizar el precursor de metionina, es necesario eliminar metJ. Por tanto, se elimina el gen metJ en *E. coli*, la expresión génica de metA o metX aumenta siempre, conduciendo a la

producción en masa del precursor de L-metionina.

Las etapas anteriores 2 y 3 pueden modificarse o eliminarse según una cepa que produce el precursor. Sin embargo, pueden ejecutarse más preferiblemente para potenciar la ruta de producción del precursor en el microorganismo de *Escherichia* sp.

5 En la etapa 4, se introduce el gen metX que codifica para homoserina O-acetiltransferasa que media en el primer proceso de la ruta de biosíntesis de metionina con el fin de aumentar la síntesis de O-acetilhomoserina, precursor de L-metionina. metX es una designación común del gen que codifica para la proteína que tiene actividad de homoserina O-acetiltransferasa, y puede obtenerse una homoserina O-acetiltransferasa foránea novedosa de diversas especies de microorganismos. Por ejemplo, el péptido de homoserina O-acetiltransferasa está codificado por los genes seleccionados de *Corynebacterium* sp., *Leptospira* sp., *Deinococcus* sp., *Pseudomonas* sp. o *Mycobacterium* sp. Preferiblemente, el péptido de homoserina O-acetiltransferasa está codificado por los genes seleccionados de *Corynebacterium glutamicum*, *Leptospira meyeri*, *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Mycobacterium smegmatis*. Más preferiblemente, el péptido de homoserina O-acetiltransferasa está codificado por los genes seleccionados de la base de datos Unipro n.º Q9RVZ8 (*Deinococcus radiodurans*), NP\_249081 (*Pseudomonas aeruginosa*) o YP\_886028 (*Mycobacterium smegmatis*). El gen metX de *Leptospira meyeri* se conocía como resistente a la retroalimentación (J Bacteriol. Enero de 1998; 180(2):250-5. Belfaiza J *et al.*) y se confirmó que varias homoserina O-acetiltransferasas eran resistentes a la retroalimentación en el laboratorio anteriormente.

20 La introducción y potenciación del gen metX puede realizarse mediante la introducción del gen o mediante la modificación de una región promotora del gen y la secuencia de nucleótidos de UTR en 5' o introduciendo la mutación en la región de ORF del gen diana. La potenciación de la expresión génica de metX da como resultado un aumento de la síntesis del precursor de metionina.

25 En la etapa 5, se potencia la actividad de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa con el fin de aumentar la síntesis de homoserina que es el precursor de O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina. thrA es una designación común del gen que codifica para el péptido que tiene actividad de aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa. Preferiblemente, una aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa codificadas por el gen de la base de datos Unipro n.º: AP\_000666. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos codificada por el gen thrA se representa en SEQ. ID. NO: 27 que tiene una mutación en la posición de aminoácido 345. La potenciación de la actividad de thrA se realiza introduciendo la mutación en el gen thrA o introduciendo adicionalmente el gen diana en el cromosoma o introduciendo adicionalmente un plásmido procesado.

30 Puede acumularse O-acetilhomoserina, que es el precursor de L-metionina, en una cepa aprovechando parte o todo el procedimiento de la etapa 1 a la etapa 5 anterior.

35 La cepa que produce el precursor de L-metionina puede prepararse a partir de la cepa que produce L-lisina, L-treonina o L-isoleucina. Preferiblemente, puede prepararse usando la cepa que produce L-treonina. Con esta cepa, la síntesis de homoserina es más fácil y la producción del precursor de metionina aumenta por tanto. De este modo, puede acumularse el precursor de metionina deleccionando o debilitando un gen implicado en la ruta de biosíntesis de treonina y luego el gen metA o metY o MetZ, usando la cepa que produce L-treonina. Se prefiere más deleccionar o debilitar el gen thrB en primer lugar y luego metB, metY o metZ para sintetizar el precursor de metionina. Mientras tanto, la potenciación de la expresión génica de metX da como resultado el aumento de la síntesis del precursor de metionina.

40 El término "cepa que produce L-treonina" se refiere a *Escherichia coli* que puede producir L-treonina *in vivo*.

45 Se usó CJM002, la cepa que produce L-treonina e independiente de L-metionina transformada a partir de TF4076 (KFCC 10718, patente coreana n.º 92-8365), la cepa mutante de *E. coli* que produce L-treonina. TF4076 tiene necesidad de metionina, y es resistente a análogos de metionina (por ejemplo, ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivalérico, AHV), análogos de lisina (por ejemplo, S-(2-aminoetil)-L-cisteína, AEC) y análogos de isoleucina (por ejemplo, ácido  $\alpha$ -aminobutílico). La TF4076 no puede sintetizar metionina *in vivo* porque es la cepa que tiene necesidad de metionina. Para usar esta cepa como cepa que produce el precursor de metionina de la invención libre de necesidad de metionina, los presentes inventores prepararon la cepa que produce L-treonina *E. coli* CJM002 libre de necesidad de metionina mediante mutación artificial usando NTG. La *E. coli* CJM002 se denominó *Escherichia coli* MF001 y se depositó en KCCM (Korean Culture Center of Microorganism, Eulim Buld., Hongje-1-Dong, Seodaemun-Ku, Seúl, 361-221, Corea) el 9 de abril de 2004 (n.º de registro: KCCM-10568). Se deleccionaron los genes metB, thrB, metJ y metA de la *E. coli* CJM002, entonces se introdujo el gen metX en el locus de metA. La cepa resultante que produce el precursor de L-metionina construida usando *E. coli* CJM002 se denominó CJM-X. El gen metX de la cepa CJM-X se derivó de *D. radiodurans*. La cepa CJM-X se transformó con el vector de expresión de thrA y se denominó CJM-X (pthrA(M)-CL).

55 La *Escherichia coli* CJM-X (pthrA(M)-CL), cepa que produce O-acetilhomoserina, preparada mediante el método anterior, se depositó el 23 de enero de 2008, con el n.º de registro KCCM 10921P.

Se usó FTR2533 que es la cepa que produce L-treonina dada a conocer en el documento PCT/KR2005/00344. Se

5 derivó FTR2533 de *Escherichia coli* TFR7624 que se derivó de *Escherichia coli* con n.º de registro KCCM10236. Y *Escherichia coli* con n.º de registro KCCM 10236 que se derivó de *Escherichia coli* TF4076. *Escherichia coli* con n.º de registro KCCM 10236 puede expresar niveles superiores de los genes *ppc* que catalizan la formación de oxaloacetato a partir de PEP y las enzimas necesarias para la biosíntesis de treonina a partir de aspartato, por ejemplo, *thrA* : aspartocinasa 1-homoserina deshidrogenasa, *thrB* : homoserina cinasa, *thrC* : treonina sintasa, permitiendo de ese modo un aumento en la producción de L-treonina. Y *Escherichia coli* FTR7624(KCCM10538) tiene un gen *tyrR* inactivado lo que produce un retroceso en la expresión del gen *tyrB* necesario para la biosíntesis de L-treonina. Y *Escherichia coli* FTR2533 (KCCM10541) es la cepa que produce L-treonina que tiene un gen *galR* inactivado, la cepa mutante de *E. coli* que produce L-treonina.

10 Se delecionaron los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* de la *E. coli* FTR2533, entonces se introdujo el gen *metX* en el locus de *metA*. La cepa resultante que produce el precursor de L-metionina construida usando *E. coli* FTR2533 se denominó CJM2-X. El gen *metX* de la cepa CJM2-X se derivó de *D. radiodurans*. La cepa CJM2-X se transformó con el vector de expresión *thrA*, y se denominó CJM2-X (*pthrA(M)-CL*).

15 La *Escherichia coli* CJM2-X (*pthrA(M)-CL*) se depositó el 12 de febrero de 2008, con el n.º de registro KCCM 10925P.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de O-acetilhomoserina, comprendiendo el método: a) fermentación de la *Escherichia coli* según la invención; b) enriquecimiento de la O-acetilhomoserina en el medio o en la *Escherichia coli*; y c) aislamiento de la O-acetilhomoserina.

20 El cultivo de la cepa que produce O-acetilhomoserina preparada anteriormente puede realizarse mediante un medio apropiado y condiciones conocidas por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica entenderán bien que el método de cultivo puede usarse fácilmente ajustando según la cepa seleccionada. Por ejemplo, el método de cultivo incluye, pero sin limitarse a cultivo discontinuo, continuo y semicontinuo. Se describen una variedad de métodos de cultivo en la siguiente referencia: "Biochemical Engineering" de James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, págs. 138-176.

25 El medio tiene que cumplir las condiciones de cultivo para una cepa específica. Se describen una variedad de medios de cultivo de microorganismos en la siguiente referencia: "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology, Washington D.C., EE.UU., 1981. Esos medios incluyen diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. La fuente de carbono se ejemplifica por hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Uno de estos compuestos o una mezcla de los mismos puede usarse como fuente de carbono. La fuente de nitrógeno se ejemplifica por una fuente de nitrógeno orgánico tal como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, líquido de maceración del maíz (CSL, *corn steep liquor*) y harina de judías y una fuente de nitrógeno inorgánico tal como urea, sulfato de amonio, cloruro de de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Uno de estos compuestos o una mezcla de los mismos puede usarse como fuente de nitrógeno. El medio en el presente documento puede incluir adicionalmente dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y sales correspondientes que contienen sodio como fuente de fosfato. El medio también puede incluir una sal de metal tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, pueden añadirse también aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Los medios o los precursores pueden añadirse al cultivo de manera discontinua o continua.

30

35

40

El pH del cultivo puede ajustarse durante el cultivo añadiendo de la forma apropiada un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. La generación de burbujas de aire puede inhibirse durante el cultivo usando un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso. Para mantener la condición aerobia del cultivo, puede inyectarse oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo. La temperatura del cultivo es convencionalmente de 20 - 45°C, preferiblemente de 25 - 40°C. El periodo de cultivo puede continuarse hasta que la producción de precursor de L-metionina alcanza un nivel deseado, y el tiempo de cultivo preferible es de 10 - 160 horas.

45

### Ejemplos

50 Las realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas tal como se muestra en los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no debe interpretarse que limitan la presente invención.

#### Ejemplo 1: Construcción de una cepa que produce el precursor de metionina

##### <1-1> Delección del gen *metB*

55 Para deleccionar el gen *metB* que codifica para cistationina sintasa en la cepa de *E. coli*, se realizó delección por FRT-PCR de una etapa (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645). Se usaron cebadores de SEQ. ID. NO: 1 y NO: 2 para la PCR usando el vector pKD3 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como molde, dando como resultado la construcción del casete de delección. Se realizó la PCR tal como sigue; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto.

5 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se introdujo por electroporación en *E. coli* (K12) W3110 transformada con el vector pKD46 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645). Antes de la electroporación, se cultivó W3110 transformada con pKD46 a 30°C en medio LB que contenía 100 µg/l de ampicilina y 5 mM de L-arabinosa hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó 0,6. Entonces, se lavó la cepa cultivada dos veces con agua destilada esterilizada y una vez más con glicerol al 10%. Se realizó la electroporación a 2500 V. Se sembró en estrías la cepa recuperada en medio de placas LB que contenía 25 µg/l de cloranfenicol, seguido por cultivo a 37°C durante la noche. Entonces, se seleccionó una cepa que presentaba resistencia a cloranfenicol.

10 Se realizó la PCR usando la cepa seleccionada como molde con los cebadores n.º 1 y 2 en las mismas condiciones. Se identificó la delección del gen metB confirmando el gen con un tamaño de 1,2 kb en gel de agarosa al 1,0%. Entonces se transformó la cepa con el vector pCP20 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) y se cultivó en medio LB para eliminar el gen marcador de cloranfenicol. Se construyó la cepa deficiente en metB final en la que el tamaño del gen metB se redujo hasta 150 pb en gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. La cepa construida se denominó W3-B.

#### 15 <1-2> Delección del gen thrB

20 Los inventores intentaron aumentar la síntesis de O-acetilhomoserina a partir de homoserina mediante la delección del gen thrB que codifica para homoserina cinasa. Particularmente, cuando se usa la cepa que produce treonina como huésped de producción de O-acetilhomoserina, es necesaria la delección del gen thrB porque la conversión de homoserina en O-fosfomomoserina por este gen es muy fuerte. Para deleccionar el gen thrB en la cepa W3-B construida anteriormente, se realizó delección por FRT-PCR de una etapa de la misma manera que se describió anteriormente para la delección del gen metB.

25 Para construir el casete de delección de thrB, se realizó la PCR usando el vector pKD4 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 3 y NO: 4 tal como sigue; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto. Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,6 kpb. El fragmento de ADN recuperado se introdujo por electroporación en la cepa W3-B transformada con el vector pKD46. Se sembró en estrías la cepa recuperada en medio de placas LB que contenía 50 µg/l de kanamicina, seguido por cultivo a 37°C durante la noche. Entonces, se seleccionó una cepa que presentaba resistencia.

30 Se realizó la PCR usando la cepa seleccionada como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 3 y NO: 4 en las mismas condiciones que anteriormente. Se identificó la delección del gen thrB seleccionando la cepa cuyo tamaño es de 1,6 kb en gel de agarosa al 1,0%. Entonces se transformó la cepa con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa deficiente en thrB final en la que el tamaño del gen thrB se redujo hasta 150 kb en gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que se eliminó el marcador de kanamicina.

35 La cepa construida se denominó W3-BT.

#### <1-3> Delección del gen metJ

Para deleccionar el gen metJ que es el gen regulador del gen metA implicado en la síntesis del precursor de metionina, se realizó delección por FRT-PCR de una etapa delección de la misma manera que se usó para la delección del gen metB.

40 Para construir un casete de delección de metJ, se realizó PCR con los cebadores de SEQ. ID. NO: 5 y NO: 6 tal como sigue; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto.

45 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se introdujo por electroporación en la cepa W3-BT transformada con el vector pKD46. Se sembró en estrías la cepa recuperada en medio de placas LB que contenía cloranfenicol, seguido por cultivo a 37°C durante la noche. Entonces, se seleccionó una cepa que presentaba resistencia.

50 Se realizó PCR usando la cepa seleccionada como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 7 y NO: 8 en las mismas condiciones que anteriormente. Se identificó la delección de metJ confirmando el gen de tamaño de 1,6 kb en el gel de agarosa al 1,0%. Entonces se transformó la cepa con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa deficiente en metJ final en la que el tamaño del gen metJ se redujo hasta 600 kb en gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones y se confirmó que el marcador de cloranfenicol se había eliminado de la cepa. La cepa construida se denominó W3-BTJ.

#### <1-4> Delección del gen metA

55 Para aumentar la producción de O-acetilhomoserina, se deleccionó el gen metA que codifica para homoserina O-succiniltransferasa en la cepa W3-BTJ. Basándose en el hallazgo de que la integración del gen metX daba como

resultado la acumulación de tanto O-succinilhomoserina como O-acetilhomoserina, se esperaba que la delección del gen *metA* diese como resultado la promoción de la acumulación de O-acetilhomoserina (tabla 3). Para deleccionar el gen *metA*, se realizó delección por FRT-PCR de una etapa.

5 Para construir el casete de delección de *metA*, se realizó PCR con los cebadores de SEQ. ID. NO: 9 y NO: 10 tal como sigue; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto.

10 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se introdujo por electroporación en la cepa de *E. coli* W3-BTJ transformada con el vector pKD46. Se sembró en estrías la cepa recuperada en medio de placas LB que contenía cloranfenicol, seguido por cultivo a 37°C durante la noche. Entonces, se seleccionó una cepa que presentaba resistencia.

15 Se realizó PCR usando la cepa seleccionada como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 9 y NO: 10 en las mismas condiciones que anteriormente. Se identificó la delección del gen *metA* confirmando el gen de tamaño de 1,1 kb en gel de agarosa al 1,0%. Entonces se transformó la cepa con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa deficiente en *metA* final en la que el tamaño del gen *metA* se redujo hasta 100 kb en gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que se eliminó el marcador de cloranfenicol. La cepa construida se denominó W3-BTJA.

#### <1-5> Sobreexpresión del gen *metX*

20 Para aumentar la producción de O-acetilhomoserina, se realizó la sobreexpresión del gen *metX* que codifica para homoserina O-acetiltransferasa.

Se realizó PCR usando el cromosoma de *Leptospira meyeri* como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 28 y NO: 29 tal como sigue; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

25 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,1 kpb. Tras el aislamiento del fragmento de ADN, se escindió el vector pCL1920 que contenía el promotor CJ1 con la enzima de restricción EcoRV y se ligó al fragmento de ADN aislado. Se transformó la *E. coli* con el vector y se seleccionaron células que portaban el plásmido en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se denominó pCJ1-MetXlme-CL. El vector se introdujo por electroporación en la cepa W3-BTJ y la cepa construida se denominó W3-BTJ/pCJMetXlme-CL.

30 Como otro método de sobreexpresión del gen *metX*, se realizó PCR usando el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 30 y NO: 31 tal como sigue; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

35 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,1 kpb. Tras el aislamiento del fragmento de ADN, se escindió el vector pCL1920 que contenía el promotor CJ1 con la enzima de restricción EcoRV y se ligó al fragmento de ADN aislado. Se transformó la *E. coli* con el vector y se seleccionaron células que portaban el plásmido en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se denominó pCJ1-MetXlme-CL. El vector se introdujo por electroporación en la cepa W3-BTJ y la cepa construida se denominó W3-BTJ/pCJMetXcgl-CL.

40 Como otro método de sobreexpresión del gen *metX*, se realizó PCR usando el cromosoma de *Deinococcus radiodurans* como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 11 y NO: 12 tal como sigue; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

45 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,1 kpb. Tras el aislamiento del fragmento de ADN, se escindió el vector pCL1920 que contenía el promotor CJ1 con la enzima de restricción EcoRV y se ligó al fragmento de ADN aislado. Se transformó la *E. coli* con el vector y se seleccionaron células que portaban el plásmido en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se denominó pCJ1-MetXdr-CL. El vector se introdujo por electroporación en la cepa W3-BTJ y la cepa construida se denominó W3-BTJ/pCJMetXdr-CL.

50 Como otro método de sobreexpresión del gen *metX*, se realizó PCR usando el cromosoma de *Mycobacterium smegmatis* como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 13 y NO: 14 tal como sigue; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

55 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN. Tras el aislamiento del fragmento de ADN, se escindió el vector pCL1920 que contenía el promotor CJ1 con la enzima de

restricción EcoRV y se ligó al fragmento de ADN aislado. Se transformó la *E. coli* con el vector y se seleccionaron células que portaban el plásmido en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se denominó pCJ-MetXmsm-CL. El vector se introdujo por electroporación en la cepa W3-BTJ y la cepa construida se denominó W3-BTJ/pCJ-MetXmsm-CL.

5 Como otro método de sobreexpresión del gen *metX*, se realizó PCR usando el cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1(pae) como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 15 y NO: 16 tal como sigue; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

10 Se sometió a electroforesis el producto de PCR en gel de agarosa al 1,0%, seguido por purificación de ADN. Tras el aislamiento del fragmento de ADN, se escindió el vector pCL1920 que contenía el promotor CJ1 con la enzima de restricción EcoRV y se ligó al fragmento de ADN aislado. Se transformó la *E. coli* con el vector y se seleccionaron células que portaban el plásmido en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se denominó pCJ-MetXpae-CL.

15 Los vectores construidos anteriormente se introdujeron por electroporación en la cepa W3-BTJA respectivamente y se comprobó la capacidad de producción de la cepa usando cultivo en matraz tal como se describe en el ejemplo 2-1.

Se mide la producción de O-acetilhomoserina de cada cepa, basándose en el 100% de producción de O-acetilhomoserina de la cepa en la que se introdujo el vector de *metX* derivado de *Corynebacterium glutamicum* (documento PCT/KR2007/003650).

20 Como resultado, la capacidad de producción de O-acetilhomoserina aumentó significativamente en las cepas transformadas cada una con el vector pCJ-MetXdra-CL, pCJ-MetXmsm-CL y pCJ-MetXlme-CL.

	Plásmido	Producción de O-acetilhomoserina (%)
W3BTJA	pCJ-metXcgl-CL	100
	pCJ-metXmsm-CL	114
	pCJ-metXlme-CL	105
	pCJ-metXpae-CL	100
	pCJ-metXdra-CL	164

25 Para la expresión estable del gen *metX* de *D. radiodurans* (*metX*(dra)) que muestra la producción más eficaz entre los tres anteriores, se insertó el gen *metX*(dra) en el cromosoma de *E. coli*. Se usó el sistema de vector pSG para construir la cepa con inserción de *metX*(dra) (Appl. Environ. Microbiol. 1993 V59. págs. 3485-3487, Villaverde. A et al).

30 Lo primero de todo, se amplificaron por PCR 600 pb de la región en el sentido de 5' del *metA* a partir de ADN genómico con los cebadores de SEQ. ID. NO: 17 y NO: 18, y se amplificaron por PCR 600 pb de la región en el sentido de 3' del *metA* a partir de ADN genómico con los cebadores de SEQ. ID. NO: 19 y NO: 20. Entonces, se amplificó por PCR el *metX*(dra) con los cebadores de SEQ. ID. NO: 21 y NO: 22. Se aisló cada fragmento de PCR mediante elución en gel y se amplificó por PCR la mezcla de fragmentos con los cebadores de SEQ. ID. NO: 23 y NO: 24. Se escindió el ADN amplificado con la enzima de restricción BamHI/EcoRI y se clonó en el vector pSG76C. Se transformó la cepa W3-BTJA con el vector construido anteriormente y se seleccionaron cepas resistentes a cloranfenicol y se detectó la clonación satisfactoria del gen *metX* dra. Se transformaron las cepas detectadas con el vector *plscel* para eliminar el marcador, y volvieron a seleccionarse. Como resultado de la confirmación de la capacidad de producción de O-acetilhomoserina, la producción de la cepa en la que se introdujo el gen *metX*(dra) era similar a la de la cepa que albergaba el plásmido pCL-metXdra.

<1-6> Sobreexpresión del gen *thrA*

Para aumentar la producción de O-acetilhomoserina más eficazmente, se realizó la sobreexpresión del gen *thrA*.

40 Para esto, se amplificó por PCR el gen *thrA* usando el cromosoma de *E. coli* CJM002 (KCCM10568), la cepa que produce L-treonina, como molde con los cebadores de SEQ. ID. NO: 25 y NO: 26. Se aisló el fragmento de ADN amplificado mediante elución en gel y se ligó con el promotor CJ1 en el vector pCL1920 usando la enzima de restricción EcoRV. El vector ligado se denominó pCJ-thrA(M)-CL y se transformó en las cepas que se prepararon mediante el método del ejemplo 1-1)-1-5. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen *thrA* se representa en SEQ. ID. NO: 27 que tiene una mutación en la posición de aminoácido 345.

45 <1-7> Conversión de la cepa que produce L-treonina

Se construyó la cepa que produce O-acetilhomoserina usando *E. coli* CJM002(KCCM10568) que es la cepa que produce L-treonina e independiente de L-metionina, tal como se describe en el ejemplo 1-1 a 1-5, y se denominó CJM-X. El cromosoma de la cepa CJM-X tiene el gen *metX* derivado de *D. radiodurans*. Y se construyó otra cepa que produce el precursor de L-metionina usando FTR2533 (KCCM10541) que es la cepa que produce L-treonina

dada a conocer en el documento PCT/KR2005/00344, tal como se describe en el ejemplo 1-1 a 1-5, y se denominó CJM-2X. El cromosoma de la cepa CJM-2X tiene el gen metX derivado de *D. radiodurans*. Se transformó cada cepa con el vector de expresión de thrA tal como se describió en el ejemplo 1-6 y se midió la producción del precursor de metionina en esta cepa.

5 Ejemplo 2: Fermentación para la producción del precursor de L-metionina

<2-1> Experimento de cultivo en matraz

10 Para investigar la capacidad de producción del precursor de metionina de la cepa construida en el ejemplo 1, se realizó un cultivo en matraz Erlenmeyer. Se cultivaron CJM2-BTJA transformada con el vector de expresión de metX y CJM-X, CJM2-X, CJM2-X/pthrA(M)-CL en medios de placas LB a 31°C durante la noche. La *Escherichia coli* CJM-BTJA (pCJ-MetX-CL) descrita en el documento PCT/KR2007/003650, la cepa que produce el precursor de O-acetilhomoserina, se depositó el 5 de julio de 2007 con el n.º de registro KCCM-10873.

15 Se inoculó una única colonia en 3 ml de medio LB que contenía espectinomycinina, seguido por cultivo a 31°C durante 5 horas. La disolución de cultivo se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de medio de producción del precursor de metionina, seguido por cultivo a 31°C, 200 rpm durante 64 horas. Se realizó HPLC para comparar con la capacidad de producción del precursor de metionina (tabla 2 y tabla 3). Como resultado, la capacidad de producción de metionina aumentó significativamente en la cepa que produce el precursor de metionina preparada a partir de la cepa que produce L-treonina libre de necesidad de metionina.

[Tabla 1]

Composición del medio de matraz para la producción del precursor de metionina

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	40 g
Sulfato de amonio	17 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> · 8H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub>	5 mg
Carbonato de calcio	30 g
Extracto de levadura	2 g
Metionina	0,15 g
Treonina	0,15 g

20 [Tabla 2]

Producción del precursor de metionina (O-acetilhomoserina) mediante cultivo en matraz

	O-acetilhomoserina (g/l)
CJM-BTJA/pCJ-metXdr-CL	15
CJM-X	14
CJM2-X	18,3
CJM2-X/pthrA(M)-CL	20,7

<2-2> Fermentación a gran escala

25 Se seleccionaron unas cuantas cepas que presentaban capacidad de producción de O-acetilhomoserina y se cultivaron en un fermentador de 5 l para producir en masa O-acetilhomoserina. Se inoculó cada cepa en medio LB que contenía espectinomycinina, seguido por cultivo a 31°C durante la noche. Entonces, se inoculó una única colonia en 10 ml de medio LB que contenía espectinomycinina, que se cultivó a 31°C durante 5 horas. La disolución de cultivo se diluyó 100 veces en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía 200 ml de medio de siembra de precursor de metionina, seguido por cultivo a 31°C, 200 rpm durante 3 - 10 horas. Se inoculó la disolución de cultivo en un fermentador de 5 l, seguido por cultivo adicional durante 20 - 100 horas mediante fermentación semicontinua. Se midió la concentración del precursor de metionina en la disolución fermentada mediante HPLC y los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 3]

Composición del medio de fermentador para la producción del precursor de metionina

Composición	Medio de siembra	Medio principal	Medio de alimentación
Glucosa (g/l)	10,1	40	600

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (g/l)	0,5	4,2	
Extracto de levadura (g/l)	10	3,2	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	3	8
Sulfato de amonio (g/l)		6,3	
NH <sub>4</sub> Cl (g/l)	1		
NaCl (g/l)	0,5		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O (g/l)	5,07		
DL-Metionina (g/l)		0,5	0,5
L-Isoleucina (g/l)	0,05	0,5	0,5
L-Treonina (g/l)		0,5	0,5

[Tabla 4]

Producción del precursor de metionina en un fermentador

	O-acetilhomoserina (g/l)
CJM-BTJA/pCJ-metXcgl-CL	>55
CJM-BTJA/pCJ-metXdra-CL	>75
CJM-X/pthrA(M)-CL	>80
CJM2-X/pthrA(M)-CL	>90

[Aplicabilidad industrial]

5 Tal como se ha descrito hasta ahora, usando la cepa que produce el precursor de metionina en la presente invención, puede producirse metionina de una manera respetuosa con el medio ambiente en comparación con el método químico de síntesis de metionina convencional. Y la L-metionina convertida a partir de O-acetilhomoserina producida a partir de la cepa según la presente invención puede usarse ampliamente en la producción de piensos para animales o aditivos de piensos para animales, además de alimentos para seres humanos o aditivos de alimentos para seres humanos.

10 **Lista de secuencias**

<110> CJ Corporation

<120>

15 <160>

<170>

20 <210> 1  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Artificial secuencia

25 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol

<400> 1  
 TTACTCTGGT GCCTGACATT TCACCGACA AAGCCCAGGG AACTTCATCA

Cgtgtaggct ggagctgctt c

30 <210> 2  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol

<400> 2  
 TTACCCCTTG TTTGCAGCCC GGAAGCCATT TTCCAGGTCG GCAATTAAA

Tcatatgaat atcctcctta g

<210> 3  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de kanamicina  
  
 10 <400> 3  
           AAAGAATATG    CCGATCGGTT    CGGGCTTAGG    CTCAGTGC    CTGTTCGGTG  
  
           Ggtgtaggct ggagctgct tc  
  
 <210> 4  
 <211> 74  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de kanamicina  
  
 20 <400> 4  
           AGACAACCGA CATCGCTTTC AACATTGGCG ACCGGAGCC GGAAGGCA AAcatatga  
  
           atatacctcc ttag  
  
 <210> 5  
 <211> 71  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol  
  
 30 <400> 5  
           atggctgaat    ggagcggcga    atatatacagc    ccatacagctg    agcacggcaa  
  
           ggtgtaggct ggagctgctt c  
  
 35 <210> 6  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol  
  
 <400> 6  
           gtattccac    gtctccgggt    taatcccat    ctacagcatg    atctccatat  
  
           gaatatacctc ctag  
  
 45 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
  
 50 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metJ  
  
 <400> 7  
 55 **gggcttgtc ggtgaaatg**

<210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 5 <213> *Escherichia coli*  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metJ  
 10 <400> 8  
**actttgcat gagcgagag**  
 <210> 9  
 <211> 70  
 15 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 <220>  
 <223> cebador para la delección de metA  
 20 <400> 9  
 CAATTTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACTTCTCGTGCGTgtgtaggctggag  
 ctgcttc  
 <210> 10  
 <211> 70  
 25 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 <220>  
 <223> cebador para la delección de metA  
 30 <400> 10  
 AATCCAGCGTTGGATTCATGTGCCGTAGATCGTATGGCGTGATCTGGTAGcatatgaatatcc  
 tccttag  
 35 <210> 11  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> *Deinococcus radiodurans*  
 40 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 <400> 11  
**gggaattcCA Tatgaccgcc gtgctcgcg**  
 45 <210> 12  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> *Deinococcus radiodurans*  
 50 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 <400> 12  
 55 **CCCAAGCTTt caactcctga gaaacgc**  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN

<213> *Mycobacterium smegmatis*  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 5 <400> 13  
**CATATGacga tcatcgaaga acga**

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Mycobacterium smegmatis*

<220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 15 <400> 14  
**AAGCTTtcac cgttgtgcaa gctc**

<210> 15  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 25 <400> 15  
**CATATGacga tcatcgaaga acga**

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 35 <400> 16  
**AAGCTTtcac cgttgtgcaa gctc**

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

<220>  
 <223> cebador para la amplificación de metA  
 45 <400> 17  
**ccggaattcC TACGCCCCCA CATA**

<210> 18  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

<220>  
 <223> cebador para la amplificación de metA  
 60 <400> 18  
**cggcggatcat AACCTGATTA CCTCA**

<210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 5 <213> *Escherichia coli*  
  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metA  
  
 10 <400> 19  
 caggagttgaTCTTCTGTGATAGTC  
  
 <210> 20  
 <211> 25  
 15 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metA  
  
 20 <400> 20  
 ccggaattcACATTGGCGTTGAGC  
  
 <210> 21  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> *Deinococcus radiodurans*  
  
 <220>  
 30 <223> cebador para la amplificación de metX  
  
 <400> 21  
 TAATCAGGTTatgaccgccgtgctc  
  
 35 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Deinococcus radiodurans*  
  
 40 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
  
 <400> 22  
 TCACAGAAGAtcaactcctgagaaa  
  
 45 <210> 23  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
  
 50 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metA  
  
 <400> 23  
 55 ccggaattcC GCCAGATTCA GCAACGG  
  
 <210> 24  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 60 <213> *Escherichia coli*  
  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metA

<400> 24  
ccggaattcC CGCGAATTTT CCAATCA

5 <210> 25  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*

10 <220>  
<223> cebador para la amplificación de thrA

<400> 25  
CTGGCAAAGC TTtcaaagga aaactccttc gt

15 <210> 26  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*

20 <220>  
<223> cebador para la amplificación de thrA

<400> 26  
25 AGTCGTGATA TCatgcgagt gttgaagttc gg

<210> 27  
<211> 820  
<212> proteína  
30 <213> *Escherichia coli*

<220>  
<223> homoserina deshidrogenasa fusionada con aspartato cinasa

35 <400> 27

MRVLKFGGTSVANAERFLRVADILES NARQQVATVLSAPAKITNHLVAMIEKTISGQDA  
 LPNISDAERIFAELLTGLAAAQPGFPLAQLKTFVDQEFQAQIKHVLHGISLLGQCPDSINA  
 ALICRGEKMSIAIMAGVLEARGHNVTVIDPVEKLLAVGHYLESTVDIAESTRRIAASRIP  
 ADHMVLMAGFTAGNEKGELVVLGRNGSDYSAAVLAACLRADCCEIWTDVDGVYTCDFRQV  
 PDARLLKSMSYQEAMELSYFGAKVLHPRITITPIAQFQIPCLIKNTGNPQAPGTLIGASRD  
 EDELPVKGISNLNMMAMFVSVSGPGMKGMVGMMAARVFAAMSRARIFVVLITQSSSEYSISF  
 CVPQSDCVRAERAMQEEFYLELKEGLLEPLAVTERLAIISVVGDMRTLRLGISAKFFAAL  
 ARANINIVAI AQSSERSISVVVNDDATTGVRVTHQMLFNTDQVIEVFVIGVGGVGGAL  
 LEQLKRQOSWLKNKHIDLRVCGVANSKALLTNVHGLNLENWQEELAQAKEPFNLGRLIRL  
 VKEYHLLNPFVIVDCTSSQAVADQYADFLREGFHVVT PNKKANTSSMDYYHQLRYAAEKSR  
 RKFLYDTNVGAGLPVIENLQNLLNAGDELMKFSGILSGSLSYIFGKLDEGMSFSEATTLA  
 REMGYTEPDPRDDLSGMDVARKLLILARETGRELELADIEIEPVLPAEFNAEGDVAAFMA  
 NLSQLDDLFAARVAKARDEGKVLRYVGNIDEDGVCRVKIAEVDGNDPLFKVKNGENALAF  
 YSHYYQPLPLVLRGYGAGNDVTAAGVFADLLRRTLSWKLGV

- 5 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> *Leptospira meyeri*
  
- 10 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 <400> 28  
**CATATGccta cctccgaaca gaa**
  
- 15 <210> 29  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> *Leptospira meyeri*
  
- 20 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 <400> 29  
**AAGCTTcaa aggaaaactc cttcgt**
  
- 25 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
  
- 30 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX  
 <400> 30  
**CAT atgccaccctcgcc**

- <210> 31  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 5 <213> *Corynebacterium glutamicum*  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX
- 10 <400> 31  
**AAGCTT ttgatgtagaactcgatg**
- Lista de secuencias**
- 15 <110> CJ Cheiljedang Corporation  
 <120> MICROORGANISMO QUE PRODUCE PRECURSOR DE L-METIONINA Y MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE PRECURSOR DE L-METIONINA USANDO EL MICROORGANISMO
- 20 <130> CHE-P913EP  
 <140> Documento EP09157283.4  
 <141> 03-04-2009
- 25 <150> Documento US12/062835  
 <151> 04-04-2008
- <160> 31  
 <170> KopatentIn 1.71
- 30 <210> 1  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol  
 <400> 1  
**ttactctggg gcctgacatt tcaccgacaa agcccagggga acttcatcac gtgtaggctg** 60
- 40 **gagctgcttc** 70
- <210> 2  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol
- 50 <400> 2  
**ttacccttg tttgcagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata** 60  
**tcctccttag** 70
- <210> 3  
 <211> 70  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de kanamicina
- 60 <400> 3

	<b>aaāgaatatg cccgatcgggtt cgggcttagg ctccagtgcc tgttcgggtgg gtgtaggctg</b>	<b>60</b>
	<b>gagctgcttc</b>	<b>70</b>
5	<210> 4 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador para la amplificación de kanamicina	
	<400> 4 <b>agacaaccga catcgctttc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata</b>	<b>60</b>
	<b>tcctccttag</b>	<b>70</b>
15	<210> 5 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol	
	<400> 5 <b>atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatacgtg agcacggcaa ggtgtaggct</b>	<b>60</b>
	<b>ggagctgctt c</b>	<b>71</b>
25	<210> 6 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol	
	<400> 6 <b>gtattcccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccatat gaatcctc</b>	<b>60</b>
35	<b>cttag</b>	<b>65</b>
40	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220> <223> cebador para la amplificación de metJ	
45	<400> 7 <b>gggctttgtc ggtgaaatg</b>	<b>19</b>
50	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220> <223> cebador para la amplificación de metJ	
55	<400> 8 <b>actttgcat gagcgagag</b>	<b>19</b>

ES 2 537 790 T3

5	<p>&lt;210&gt; 9          &lt;211&gt; 70          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; <i>Escherichia coli</i></p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; cebador para la amplificación de metA</p>	
10	<p>&lt;400&gt; 9  <b>caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg</b></p> <p><b>gagctgcttc</b></p>	<p>60          70</p>
15	<p>&lt;210&gt; 10          &lt;211&gt; 70          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; <i>Escherichia coli</i></p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; cebador para la delección de metA</p>	
20	<p>&lt;400&gt; 10  <b>aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata</b></p> <p><b>tcctccttag</b></p>	<p>60          70</p>
25	<p>&lt;210&gt; 11          &lt;211&gt; 29          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; <i>Deinococcus radiodurans</i></p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; cebador para la amplificación de metX</p>	
30	<p>&lt;400&gt; 11  <b>gggaattcca tatgaccgcc gtgctcgcg</b></p>	<p>29</p>
35	<p>&lt;210&gt; 12          &lt;211&gt; 27          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; <i>Deinococcus radiodurans</i></p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; cebador para la amplificación de metX</p>	
40	<p>&lt;400&gt; 12  <b>ccaagcttt caactcctga gaaacgc</b></p>	<p>27</p>
45	<p>&lt;210&gt; 13          &lt;211&gt; 24          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; <i>Mycobacterium smegmatis</i></p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; cebador para la amplificación de metX</p>	
50	<p>&lt;400&gt; 13  <b>catatgacga tcatcgaaga acga</b></p>	<p>24</p>
55	<p>&lt;210&gt; 14          &lt;211&gt; 24          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; <i>Mycobacterium smegmatis</i></p>	
60		

	<220>		
	<223>	cebador para la amplificación de metX	
5	<400>	14 <b>aagctttcac cgttgtgcaa gctc</b>	24
	<210>	15	
	<211>	24	
10	<212>	ADN	
	<213>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<220>		
	<223>	cebador para la amplificación de metX	
15	<400>	15 <b>catatgacga tcatcgaaga acga</b>	24
	<210>	16	
	<211>	24	
20	<212>	ADN	
	<213>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<220>		
	<223>	cebador para la amplificación de metX	
25	<400>	16 <b>aagctttcac cgttgtgcaa gctc</b>	24
	<210>	17	
30	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	<i>Escherichia coli</i>	
	<220>		
35	<223>	cebador para la amplificación de metA	
	<400>	17 <b>ccggaattcc tacgccccca cata</b>	24
40	<210>	18	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	<i>Escherichia coli</i>	
45	<220>		
	<223>	cebador para la amplificación de metA	
	<400>	18 <b>cggcgggtcat aacctgatta cctca</b>	25
50	<210>	19	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	<i>Escherichia coli</i>	
55	<220>		
	<223>	cebador para la amplificación de metA	
	<400>	19 <b>caggagttga tcttctgtga tagtc</b>	25
60	<210>	20	
	<211>	24	
	<212>	ADN	

	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
5	<223> cebador para la amplificación de metA	
	<400> 20	
	<b>ccggaattca cattggcggtt gagc</b>	24
10	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Deinococcus radiodurans</i>	
15	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de metX	
	<400> 21	
	<b>taatcagggtt atgaccgccg tgctc</b>	25
20	<210> 22	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Deinococcus radiodurans</i>	
25	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de metX	
	<400> 22	
30	<b>tcacagaaga tcaactcctg agaaa</b>	25
	<210> 23	
	<211> 27	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de metA	
	<400> 23	
40	<b>ccggaattcc gccagattca gcaacgg</b>	27
	<210> 24	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de metA	
50	<400> 24	
	<b>ccggaattcc cgcgatttt ccaatca</b>	27
	<210> 25	
55	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
60	<223> cebador para la amplificación de thrA	
	<400> 25	
	<b>ctggcaaagc tttcaaagga aaactccttc gt</b>	32
	<210> 26	

<211> 32  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

5 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de thrA

<400> 26  
 agtcgtgata tcatgcgagt gttgaagttc gg

32

10 <210> 27  
 <211> 820  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

15 <220>  
 <223> homoserina deshidrogenasa fusionada con aspartato cinasa

<400> 27  
 Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Ala Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Leu Glu Ser Asn Ala Arg Gln Gly Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile Thr Asn His Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Met Ile Glu Lys Thr Ile Ser Gly Gln Asp Ala Leu Pro Asn Ile  
 50 55 60  
 Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Leu Thr Gly Leu Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Gln Pro Gly Phe Pro Leu Ala Gln Leu Lys Thr Phe Val Asp Gln  
 85 90 95  
 Glu Phe Ala Gln Ile Lys His Val Leu His Gly Ile Ser Leu Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Cys Pro Asp Ser Ile Asn Ala Ala Leu Ile Cys Arg Gly Glu Lys  
 115 120 125  
 Met Ser Ile Ala Ile Met Ala Gly Val Leu Glu Ala Arg Gly His Asn  
 130 135 140  
 Val Thr Val Ile Asp Pro Val Glu Lys Leu Leu Ala Val Gly His Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr Arg Arg Ile Ala Ala  
 165 170 175  
 Ser Arg Ile Pro Ala Asp His Met Val Leu Met Ala Gly Phe Thr Ala  
 180 185 190  
 20 Gly Asn Glu Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Arg Asn Gly Ser Asp

ES 2 537 790 T3

195					200					205					
Tyr	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg	Ala	Asp	Cys	Cys	Glu
	210					215					220				
Ile	Trp	Thr	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln	Val
225					230					235					240
Pro	Asp	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Ser	Met	Ser	Tyr	Gln	Glu	Ala	Met	Glu
				245					250					255	
Leu	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	His	Pro	Arg	Thr	Ile	Thr	Pro
			260					265					270		
Ile	Ala	Gln	Phe	Gln	Ile	Pro	Cys	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Gly	Asn	Pro
		275					280					285			
Gln	Ala	Pro	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Ala	Ser	Arg	Asp	Glu	Asp	Glu	Leu
	290					295					300				
Pro	Val	Lys	Gly	Ile	Ser	Asn	Leu	Asn	Asn	Met	Ala	Met	Phe	Ser	Val
305						310					315				320
Ser	Gly	Pro	Gly	Met	Lys	Gly	Met	Val	Gly	Met	Ala	Ala	Arg	Val	Phe
				325					330					335	
Ala	Ala	Met	Ser	Arg	Ala	Arg	Ile	Phe	Val	Val	Leu	Ile	Thr	Gln	Ser
			340					345					350		
Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ile	Ser	Phe	Cys	Val	Pro	Gln	Ser	Asp	Cys	Val
		355					360					365			
Arg	Ala	Glu	Arg	Ala	Met	Gln	Glu	Glu	Phe	Tyr	Leu	Glu	Leu	Lys	Glu
	370					375					380				
Gly	Leu	Leu	Glu	Pro	Leu	Ala	Val	Thr	Glu	Arg	Leu	Ala	Ile	Ile	Ser
385					390					395					400
Val	Val	Gly	Asp	Gly	Met	Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	Ile	Ser	Ala	Lys	Phe
				405					410					415	
Phe	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Val	Ala	Ile	Ala	Gln
			420					425					430		
Gly	Ser	Ser	Glu	Arg	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Val	Asn	Asn	Asp	Asp	Ala
		435					440					445			
Thr	Thr	Gly	Val	Arg	Val	Thr	His	Gln	Met	Leu	Phe	Asn	Thr	Asp	Gln
	450					455					460				
Val	Ile	Glu	Val	Phe	Val	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu
465					470					475					480
Leu	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg	Gln	Gln	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Lys	His	Ile
				485					490					495	
Asp	Leu	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Ala	Asn	Ser	Lys	Ala	Leu	Leu	Thr	Asn
			500					505					510		
Val	His	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu	Asn	Trp	Gln	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala
		515					520					525			
Lys	Glu	Pro	Phe	Asn	Leu	Gly	Arg	Leu	Ile	Arg	Leu	Val	Lys	Glu	Tyr
	530					535					540				
His	Leu	Leu	Asn	Pro	Val	Ile	Val	Asp	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Ala	Val
545					550					555					560
Ala	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Glu	Gly	Phe	His	Val	Val	Thr
				565					570					575	

Pro Asn Lys Lys Ala Asn Thr Ser Ser Met Asp Tyr Tyr His Gln Leu  
 580 585 590  
 Arg Tyr Ala Ala Glu Lys Ser Arg Arg Lys Phe Leu Tyr Asp Thr Asn  
 595 600 605  
 Val Gly Ala Gly Leu Pro Val Ile Glu Asn Leu Gln Asn Leu Leu Asn  
 610 615 620  
 Ala Gly Asp Glu Leu Met Lys Phe Ser Gly Ile Leu Ser Gly Ser Leu  
 625 630 635 640  
 Ser Tyr Ile Phe Gly Lys Leu Asp Glu Gly Met Ser Phe Ser Glu Ala  
 645 650 655  
 Thr Thr Leu Ala Arg Glu Met Gly Tyr Thr Glu Pro Asp Pro Arg Asp  
 660 665 670  
 Asp Leu Ser Gly Met Asp Val Ala Arg Lys Leu Leu Ile Leu Ala Arg  
 675 680 685  
 Glu Thr Gly Arg Glu Leu Glu Leu Ala Asp Ile Glu Ile Glu Pro Val  
 690 695 700  
 Leu Pro Ala Glu Phe Asn Ala Glu Gly Asp Val Ala Ala Phe Met Ala  
 705 710 715 720  
 Asn Leu Ser Gln Leu Asp Asp Leu Phe Ala Ala Arg Val Ala Lys Ala  
 725 730 735  
 Arg Asp Glu Gly Lys Val Leu Arg Tyr Val Gly Asn Ile Asp Glu Asp  
 740 745 750  
 Gly Val Cys Arg Val Lys Ile Ala Glu Val Asp Gly Asn Asp Pro Leu  
 755 760 765  
 Phe Lys Val Lys Asn Gly Glu Asn Ala Leu Ala Phe Tyr Ser His Tyr  
 770 775 780  
 Tyr Gln Pro Leu Pro Leu Val Leu Arg Gly Tyr Gly Ala Gly Asn Asp  
 785 790 795 800  
 Val Thr Ala Ala Gly Val Phe Ala Asp Leu Leu Arg Thr Leu Ser Trp  
 805 810 815  
 Lys Leu Gly Val  
 820

5 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> *Leptospira meyeri*

10 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX

<400> 28  
 catatgccta cctccgaaca gaa

23

15 <210> 29  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> *Leptospira meyeri*

20 <220>  
 <223> cebador para la amplificación de metX

<400> 29

	<b>aagctttcaa aggaaaactc cttcgt</b>	<b>26</b>
	<210> 30	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
	<220>	
10	<223> cebador para la amplificación de metX	
	<400> 30	
	<b>catatgcca ccctcgcgc</b>	<b>20</b>
	<210> 31	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
	<220>	
20	<223> cebador para la amplificación de metX	
	<400> 31	
	<b>aagcttttag atgtagaact cgatg</b>	<b>25</b>

## REIVINDICACIONES

1. *Escherichia coli* que puede producir O-acetilhomoserina, caracterizada por que:
  - a) la *Escherichia coli* contiene un gen de *Deinococcus sp.* o *Mycobacterium sp.* que codifica para un polipéptido que tienen actividad homoserina O-acetiltransferasa; y
  - 5 b) la *Escherichia coli* sobreexpresa un gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa o expresa un gen que codifica para un polipéptido de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa mutado de manera que la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa está potenciada.
- 10 2. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que el gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa es de *Deinococcus radiodurans* o *Mycobacterium smegmatis*.
3. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que el polipéptido de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 27.
4. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que se debilita o se inactiva la actividad cistationina gamma sintasa reduciendo o eliminando la expresión del gen o reduciendo o eliminando las propiedades catalíticas de la proteína expresada.
- 15 5. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que se debilita o se inactiva la actividad homoserina cinasa reduciendo o eliminando la expresión del gen o reduciendo o eliminando las propiedades catalíticas de la proteína expresada.
6. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que se debilita o se inactiva el regulador de la transcripción metJ reduciendo o eliminando la expresión del gen o reduciendo o eliminando las propiedades catalíticas de la proteína expresada.
- 20 7. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que la *Escherichia coli* es la cepa que produce treonina *Escherichia coli* MF001 depositada con el número de registro KCCM 10568 que se ha modificado para:
  - a) contener un gen de *Deinococcus sp.* o *Mycobacterium sp.* que codifica para un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa; y
  - 25 b) sobreexpresar un gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa o expresar un gen que codifica para un polipéptido de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa mutado de manera que la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa está potenciada.
- 30 8. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que la *Escherichia coli* es la cepa que produce treonina *Escherichia coli* FTR2533 depositada con el número de registro KCCM 10541 que se ha modificado para:
  - a) contener un gen de *Deinococcus sp.* o *Mycobacterium sp.* que codifica para un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa; y
  - 35 b) sobreexpresar un gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa o expresar un gen que codifica para un polipéptido de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa mutado de manera que se potencia la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa.
9. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que la *Escherichia coli* es CJM-X(pthA(M)-CL) depositada con el número de registro KCCM 10921P.
- 40 10. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que la *Escherichia coli* es CJM2-X(pthA(M)-CL) depositada con el número de registro KCCM 10925P.
- 45 11. Método de producción de O-acetilhomoserina, que comprende: a) la fermentación de la *Escherichia coli* según cualquier reivindicación seleccionada de la reivindicación 1 a la reivindicación 10; b) el enriquecimiento de la O-acetilhomoserina en el medio o en la *Escherichia coli*; y c) el aislamiento de la O-acetilhomoserina.

Figura 1

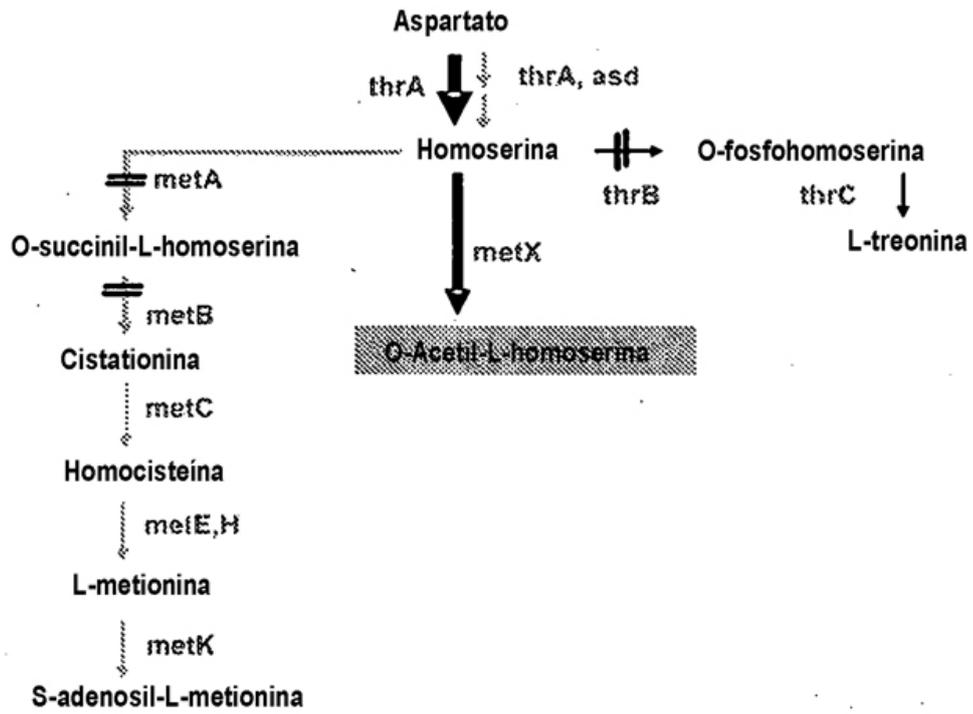


Figura 2

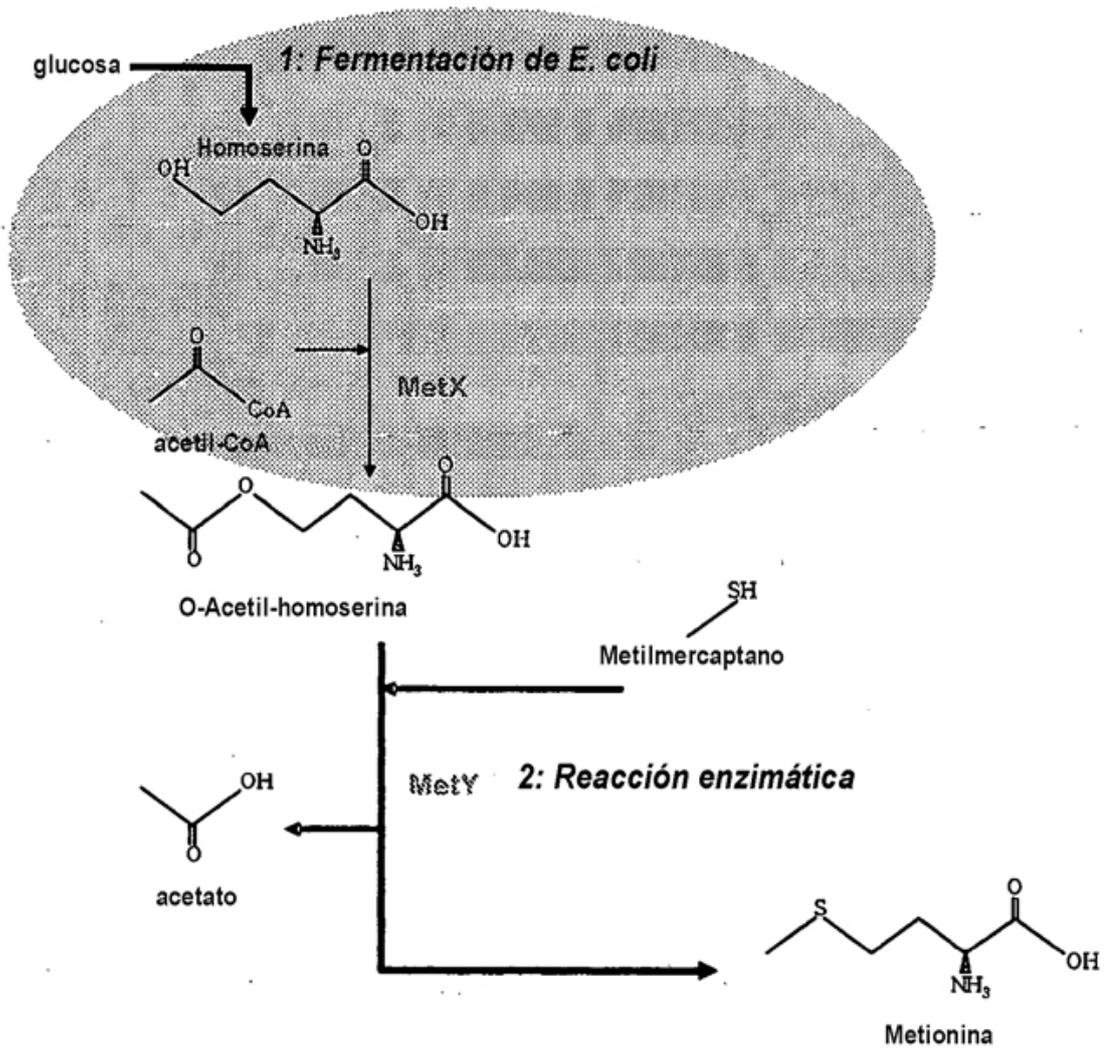


Figura 3

